

資料

食中毒原因食品からのノロウイルス遺伝子検出法の確立（第I報）

上 村 晃 秀 上 野 伸 広 本 田 俊 郎¹
 養 田 祥 子 湯 田 充 典 吉 國 謙 一 郎
 藤 崎 隆 司

1 はじめに

ノロウイルス（以下「NV」という。）は、乳幼児から高齢者に至る幅広い年齢層で急性胃腸炎を引き起こす。このNVによる流行は11月頃から始まり、1月から2月がピークとなる。その後は減少するが、年間を通じて患者は散見される。

厚生労働省の平成18年食中毒発生状況によると、NVによる食中毒は、総事件数1491件のうち499件（33.5%）と、カンピロバクターに次いで多く、総患者数39026名のうち27616名（71.0%）を占め、患者数では第1位となっている¹⁾。

2004年度から2008年度に、本県（鹿児島市を除く）でNVが原因の食中毒事例として18件の報告がある。これは、細菌等を含めた66件の事件事数の中で最も多い。

NVの培養系は確立しておらず、食中毒の原因として検出できた食品は、カキ（二枚貝）以外は稀少であり、他の食品からのNV遺伝子検出法の確立が急務である。

本研究は、当センターの調査研究事業として食中毒発生時における食品等からのNV遺伝子検出を目標に掲げて3ヶ年計画で実施している。

今回、第I報として、いろいろな食品からのNV検出における回収率・検出感度等について、当センターにて糞便検体でのみ実施している方法の限界を知る事を目的に検討したので報告する。

2 材料と方法

2.1 検査材料

食品はマグロの刺身、鶏刺し、ポテトサラダ、白菜の浅漬け、キャベツの千切りの市販品5種類を用いた。

添加用ウイルス液として、感染性胃腸炎患者糞便10%乳剤（GII 1×10¹⁰copies/mL）を原液とし、10¹～10⁴倍ま

で段階希釈した添加ウイルス液5系列を100μLずつ、5種類の食品10gに添加し、PBS90mLを加え、ストマッカー処理後、測定用試料とした。

2.2 検査方法

1食品につき希釈倍率の異なるウイルス液5系列（原液、10¹、10²、10³、10⁴）を添加した5食品の計25試料について、図1に示した検査方法でLightCycler 2.0（Roche）を使用し、リアルタイムPCRを実施した。測定は、同じ日に同じcDNAを使用し、連続3回の測定を行った。

測定の結果、CP値が得られた試料を陽性と判断し、解析を行った。

3 結果

回収率は、最高56.8%、最低22.2%となり、平均32.7%であった。また、一番回収率の高い食品は鶏刺し40.2%次いでマグロの刺身34.5%、白菜の浅漬け32.2%、ポテトサラダ31.4%、キャベツの千切り25.1%の順であった。添加ウイルス量が多いほど、回収率はやや高い傾向であった。

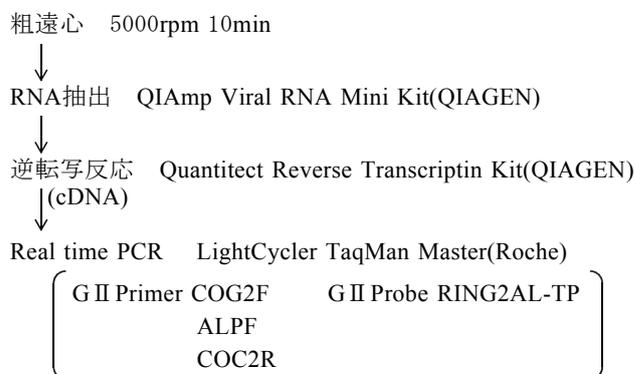


図1 当センターのNV遺伝子検査法（糞便）

1 鹿児島県立大島病院

表1 食品別添加回収試験

食品名と添加ウイルス量 (copies/g)	CP値				実測値 (copies/g)	回収率 (%)	
	1回目	2回目	3回目	平均			
マグロ 刺身	1×10 ⁸	26.86	32.54	26.79	28.73	3.7×10 ⁷	37.0
	1×10 ⁷	30.70	30.58	29.60	30.29	4.0×10 ⁶	40.1
	1×10 ⁶	33.64	33.86	33.41	33.64	3.5×10 ⁵	34.8
	1×10 ⁵	36.64	37.45	38.34	37.48	2.6×10 ⁴	26.1
	1×10 ⁴	-	-	-	-	-	-
鶏刺し	1×10 ⁸	26.95	27.47	27.37	27.26	4.2×10 ⁷	41.8
	1×10 ⁷	30.46	31.43	30.43	30.77	3.1×10 ⁶	31.1
	1×10 ⁶	33.82	35.14	32.93	33.96	3.1×10 ⁵	31.1
	1×10 ⁵	35.73	36.56	36.39	36.23	5.7×10 ⁴	56.8
	1×10 ⁴	-	38.94	-	38.94	(6.3×10 ³)	(63.2)
浅漬け	1×10 ⁸	28.00	27.56	26.61	27.39	3.5×10 ⁷	34.9
	1×10 ⁷	29.91	31.51	30.29	30.57	4.0×10 ⁶	40.1
	1×10 ⁶	33.72	35.28	33.39	34.13	2.8×10 ⁵	28.0
	1×10 ⁵	36.60	38.50	37.36	37.49	2.6×10 ⁴	25.7
	1×10 ⁴	36.80	-	36.67	36.74	(3.6×10 ⁴)	(36.0)
ポテト サラダ	1×10 ⁸	27.82	27.33	26.48	27.21	4.0×10 ⁷	39.6
	1×10 ⁷	30.84	31.73	30.35	30.97	2.6×10 ⁶	26.3
	1×10 ⁶	33.71	35.31	33.35	34.12	2.8×10 ⁵	28.2
	1×10 ⁵	37.38	-	36.83	37.11	(2.6×10 ⁴)	(26.5)
	1×10 ⁴	-	-	-	-	-	-
キャベツ の千切り	1×10 ⁸	27.47	28.39	27.52	27.79	2.8×10 ⁷	28.2
	1×10 ⁷	31.33	31.69	29.78	30.93	2.7×10 ⁶	27.3
	1×10 ⁶	34.26	34.66	33.74	34.22	2.3×10 ⁵	22.6
	1×10 ⁵	37.63	37.30	37.00	37.31	2.2×10 ⁴	22.2
	1×10 ⁴	36.72	-	37.84	37.28	(3.0×10 ⁴)	(297.1)

(注)：() 中数値は、CP値が3回すべてで得られなかったため、参考値とする。

確実に検出できた添加ウイルス量は、ポテトサラダを除いて1×10⁵copies/gであった。また、鶏刺し、白菜の浅漬け、キャベツの千切りは1×10⁴copies/gにおいても一部検出可能であったことから、この3食品については検出感度がやや高い傾向であった。一方、ポテトサラダは添加ウイルス量1×10⁵copies/gでも一部検出することができず、1×10⁴copies/gではまったく検出できなかった。したがって検出感度は、白菜の浅漬けとキャベツの千切りが高く、次いで鶏刺し、マグロの刺身でポテトサラダが最も低かった(表1)。

4 考察

回収率は、最も高いと予想していたキャベツの千切りが低く、最も低いと予想していた鶏刺しが高い傾向を認めた。これは、キャベツにPCRへの何らかの影響を与える物質が存在したことも考えられたが、その原因は不明であった。また、鶏刺しについては、ストマッカー処理後の乳剤中に油脂成分と思われる浮遊物を認めたが、この成分は回収率に大きな影響を及ぼさない結果であった。その他の食品について、マグロの血液やポテトサラ

ダのマヨネーズ、浅漬けの調味料等が回収率に影響を及ぼすと予想されたが、今回の結果からは大きな影響はないと思われた。

これらのことから、RNA抽出時に用いたQIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)により、今回の食品中に含まれるPCRに対する阻害物質の多くを、一様に取り除くことができたものと考えられ、その結果、平均32.7%の回収率が得られたと推察した。

検出感度については、添加ウイルス量1×10⁴copies/gにおいても一部検出可能であった鶏刺し、白菜の浅漬け、キャベツの千切りの3食品は阻害物質が少ないか、或いは効率よく取り除かれたとも考えられた。

最も検出感度が低く回収率も低かったポテトサラダは、ジャガイモ、ニンジン、キュウリ、ハムにマヨネーズ等で味付けしたものであった。この中で最も結果に影響を及ぼしそうな物質はマヨネーズと思われた。これについては、今後検証する必要がある。

一方、キャベツの千切りは回収率が低いにもかかわらず、検出感度が高い傾向を認めた。これは、ストマッカー処理時にキャベツの繊維にウイルス粒子が取り込ま

れ、回収率が低下し、さらに阻害物質が少なかったことにより、他より検出感度が上がったとも考えられた。

今回使用した添加用ウイルス液は、糞便乳剤を粗遠心した上清をそのまま用いたため、ウイルス粒子が均一になっていなかった可能性も疑われた。次回からは添加用ウイルス液として、粗遠心した上清をフィルターを過して使用することが必要であると思われた。

5 まとめ

今回の検討において、当センターで実施している糞便用のリアルタイムPCR法では、食品1g中に約10万コピーのNVが存在しないと検出できないことが確認できた。100コピー程度のウイルス量で感染を引き起こすNVを食品から検出するには、現在の方法の感度を1000倍程度上げる必要がある。

今後、食品を超遠心してウイルスを濃縮する方法²⁾や各研究機関で検討されている方法等を参考に検討を重ねて行きたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ；ノロウイルスに関するQ&A, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html>
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知；ノロウイルスの検出法について（食安監発第1105001号），平成15年11月5日